

Safiera, et al., Aktivitas Antioksidan dan Kemampuan Proteksi terhadap Kerusakan DNA....

Aktivitas Antioksidan dan Kemampuan Proteksi terhadap Kerusakan DNA dari Protein Isolat Biji Melinjo (*Gnetum Gnemon* L.) Terhidrolisis Menggunakan Alkalase Terimobilisasi (*Antioxidant Activity and Protection Ability Against DNA Damage of Isolate Protein Melinjo (Gnetum gnemon L.) Seed Hydrolyzed using Immobilized Alcalase*)

Anandini Aulia Safiera¹, Endah Puspitasari¹, Tri Agus Siswoyo^{2*}

¹Fakultas Farmasi, Universitas Jember

²Center for Development of Advanced Sciences and Technology (CDAST), Universitas Jember
Jalan Kalimantan no 37, Jember 68121

*email korespondensi: triagus.faperta@unej.ac.id

Abstract

Hydrolyzed protein isolates of melinjo seed using free alcalase has been known to have antioxidant potential. However, free alcalase can only be used once. Enzymes immobilization technique with entrapment method would overcome this problem. The immobilized enzyme characteristic was observed by SEM and hydrolysis degree value. The success of hydrolysis process was observed by SDS-PAGE. Antioxidant activity test was determined by the ability to inhibit hydroxyl radical and protection against DNA damage in 1% agarose gel. The result showed that protein isolates from melinjo seed had been successfully hydrolyzed by immobilized alcalase. Following hydrolysis showed that immobilized alcalase was effective to hydrolyze protein up to four times. Based on hydroxyl radical reduction activity test, antioxidant activity of hydrolyzed protein using immobilized alcalase had the same as that of glutathione as positive control antioxidant activity. In addition, hydrolyzed protein using immobilized alcalase had the ability to protect DNA damage which showed by reversible change of supercoil band.

Keywords: *melinjo seed, hydrolyzed protein, immobilized alcalase, antioxidant*

Abstrak

Protein isolat biji melinjo yang dihidrolisis menggunakan alkalase bebas diketahui memiliki potensi antioksidan. Namun, enzim alkalase bebas tersebut hanya dapat digunakan dalam sekali perlakuan. Solusi untuk penggunaan enzim alkalase yaitu dengan teknik imobilisasi enzim menggunakan metode penjerapan. Karakterisasi imobilisasi enzim dapat dilihat melalui SEM dan nilai derajat hidrolisis. Keberhasilan proses hidrolisis dapat dilihat melalui SDS-PAGE. Uji aktivitas antioksidan ditentukan dengan melihat kemampuan dalam menghambat radikal hidroksil dan proteksi terhadap kerusakan DNA dalam gel agarosa 1%. Hasil menunjukkan bahwa protein isolat biji melinjo telah berhasil dihidrolisis menggunakan enzim alkalase terimobilisasi. Hidrolisis secara berulang menunjukkan enzim alkalase terimobilisasi efektif menghidrolisis protein hingga empat kali. Berdasarkan uji aktivitas peredaman radikal hidroksil, protein terhidrolisis menggunakan alkalase terimobilisasi memiliki aktivitas antioksidan yang sama dengan glutathione (kontrol positif). Selain itu, protein terhidrolisis menggunakan alkalase terimobilisasi juga memiliki kemampuan dalam proteksi kerusakan DNA yang ditandai dengan perubahan kembali bentuk pita *supercoil*.

Kata kunci: biji melinjo, protein terhidrolisis, alkalase terimobilisasi, antioksidan

Pendahuluan

Penyakit degeneratif telah menjadi penyebab kematian terbesar di dunia hingga saat ini. Menurut WHO, hampir 17 juta orang meninggal lebih awal tiap tahunnya akibat epidemi global penyakit degeneratif. Hal ini tidak terlepas dari perubahan pola hidup dan makin tingginya usia harapan hidup masyarakat. Peningkatan penyakit degeneratif ini disebabkan karena gaya hidup yang tidak sehat, seperti merokok, pola makan yang tidak seimbang, rendahnya asupan buah dan sayur, dan rendahnya aktivitas fisik [1]. Kesalahan pola makan dan gaya hidup yang tidak sehat ini dapat mengaktifkan radikal bebas yang dapat merusak tubuh [2].

Radikal bebas yang terbentuk dalam tubuh akan menghasilkan radikal bebas baru melalui reaksi berantai yang akhirnya jumlahnya terus bertambah dan menyerang tubuh [3]. Salah satu jenis radikal bebas yaitu radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) yang diketahui merupakan senyawa radikal yang paling berbahaya karena mempunyai tingkat reaktivitas sangat tinggi. Radikal hidroksil dapat merusak DNA. Reaksi berantai yang disebabkan oleh radikal bebas ini dapat dihentikan dengan antioksidan [4].

Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L.) merupakan tanaman yang banyak dimanfaatkan di Indonesia. Bagian paling penting dari tanaman melinjo yaitu bijinya [5] yang diketahui mengandung protein tinggi (9-10%). Protein ini memiliki aktivitas antioksidan alami [6]. Pada penelitian yang dilakukan Sembodo [7] menjelaskan bahwa protein biji melinjo yang telah terhidrolisis memiliki peredaman radikal hidroksil dan kemampuan proteksi terhadap kerusakan DNA lebih tinggi daripada protein biji melinjo yang tidak terhidrolisis. Hidrolisis protein biji melinjo dilakukan dengan cara enzimatis [8]. Menurut Siswoyo *et al.* [9], salah satu enzim yang dapat meningkatkan aktivitas antioksidan yaitu enzim alkalase. Tetapi enzim alkalase ini hanya dapat digunakan satu kali dalam penelitian. Sementara enzim alkalase sangat mahal. Jadi, cara untuk mengatasi hal tersebut yaitu dengan teknik imobilisasi. Teknik imobilisasi ini menghasilkan enzim yang dapat digunakan secara berulang-ulang dan dapat menekan biaya [10]. Namun, sejauh ini belum diketahui efek teknik imobilisasi tersebut terhadap aktivitas produk hidrolisat yang dihasilkan. Oleh karena itu, penelitian ini ditujukan untuk mengetahui bagaimana efektivitas imobilisasi enzim dalam aktivitas

antioksidan. Dalam hal ini adalah peredaman radikal hidroksil dan juga kemampuan proteksi terhadap kerusakan DNA.

Metode Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *true experimental laboratories*. Pemilihan sampel dilakukan secara acak. Sampel yang digunakan adalah biji melinjo yang telah masak secara fisiologis, ditandai dengan kulit luar berwarna merah. Biji melinjo diperoleh pada bulan Juli 2015 dari daerah Kalibaru, Kabupaten Banyuwangi, yang dipanen pada pagi hari. Terdapat 5 kelompok perlakuan, yaitu kelompok protein kasar (Gg-PK), kelompok protein isolat (Gg-PI), kelompok protein yang dihidrolisis dengan alkalase terimobilisasi (Gg-PH), kelompok protein yang dihidrolisis dengan alkalase bebas (Gg-PHB), dan kelompok kontrol positif (GSH). Masing-masing kelompok diuji aktivitas antioksidan pada berbagai konsentrasi (0,0002; 0,002; 0,02; 0,2; dan 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Penelitian ini dilakukan di laboratorium CDAST Universitas Jember pada bulan September 2015–September 2016.

Bahan

Bahan yang digunakan adalah HCl 1 M, NaOH 1 M, enzim alkalase 2.4 L FG (2,4 AU/g dan densitasnya 1,18 g/mL), isopropil alkohol (Wako), HCl (Sigma), PEG 20.000, NaF 1 M (Wako), *dimethyldimethoxysilane* (DMDMOS) (Aldrich), *tetramethoxysilane* (TMOS) (Shin-etsu), *bovine serum albumin* (BSA) (Sigma), FeCl_3 (Nacalai tesque), H_2O_2 (Riedel-de Haen), deoksiribosa (Wako), asam askorbat (Nacalai tesque), *tiobarbituric acid* (TBA) (Sigma-aldrich), *trichloroacetic acid* (TCA) (Merck), plasmid DNA dari bakteri *Escherichia coli*, L-leucine (Wako).

Preparasi Imobilisasi Enzim

Imobilisasi enzim alkalase menggunakan metode penjerapan berdasarkan prosedur Reetz [11]. Larutan alkalase 3,12 mL, PEG 20.000 0,8 mL, NaF 0,4 mL, dan isopropil alkohol 0,8 mL dicampur dan dihomogenkan dalam vial 10 mL menggunakan batang pengaduk. Kemudian ditambahkan 24 mmol DMDMOS/TMOS (1:1). Larutan diaduk pada suhu ruang sampai terbentuk gel. Lalu gel yang diperoleh dikeringkan pada suhu ruang selama 48 jam. Karakterisasi enzim terimobilisasi diamati dengan SEM (Hitachi TM 3000).

Ekstraksi dan Isolasi Protein Biji Melinjo

Biji melinjo (25 mg) dihaluskan dengan menambahkan akuades 75 ml (1:3) sampai homogen. Kemudian disaring dan disentrifus (Tomy MRX-150) selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 25°C. Supernatan yang dihasilkan dari proses ini disebut sebagai protein kasar biji melinjo (Gg-PK).

Isolasi protein menggunakan metode Salcedo *et al.* [12] yaitu presipitasi isoelektrik. Supernatan hasil sentrifus (Gg-PK) diatur pH menjadi 4 dengan menambahkan 1 M HCl. Larutan disentrifus pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 25°C untuk memisahkan protein berupa endapan dan cairan sisa yang mengandung bahan-bahan terlarut seperti gula, mineral, dan sebagainya. Endapan protein dilarutkan dengan akuades dan diatur pHnya sampai 8 dengan menggunakan NaOH 1 N. Hasil dari isolasi protein ini disebut sebagai protein isolat biji melinjo (Gg-PI).

Hidrolisis Protein Isolat Biji Melinjo

Sebelum dilakukan proses hidrolisis, maka dilakukan optimasi suhu inkubasi, waktu inkubasi, jumlah enzim, dan konsentrasi substrat. Optimasi ini merujuk pada Matra [13]. Suhu inkubasi, waktu inkubasi, jumlah enzim, dan konsentrasi substrat terpilih adalah 50°C, 4 jam, 5 mg, dan 5 mg/mL.

Hidrolisis protein dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Siswoyo & Sugiharto [14]. Protein isolat biji melinjo (Gg-PI) 200 µL ditambah dengan 5 mg enzim alkalase terimobilisasi dan 300 µL buffer fosfat (pH 8). Selanjutnya diinkubasi (Stuart SI600) pada suhu 50°C selama 4 jam. Kemudian disentrifus (Hitachi CF15RXII) pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 25°C. Bagian supernatan diambil sebagai protein hidrolisat biji melinjo (Gg-PH) dan ditentukan derajat hidrolisisnya. Pelet yang dihasilkan kemudian digunakan untuk melihat hasil pengulangan penggunaan enzim alkalase terimobilisasi.

Derajat hidrolisis ditentukan dengan menggunakan TNBS [15]. Sebanyak 5 µL (Gg-PH) dicampur dengan 400 µL 0,2 M buffer fosfat (pH 8) dan 200 µL 0,1% TNBS, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 400 µL 0,1 N Na₂SO₃ lalu didinginkan pada suhu ruang, kemudian dibaca absorbansinya pada λ 420 nm. Kurva standar L-leucine digunakan untuk mengetahui konsentrasi asam amino.

Perhitungan derajat hidrolisis (DH) ditentukan dengan Persamaan 1.

$$DH = h/h_{tot} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

dimana h adalah jumlah ikatan peptida yang dihidrolisis dan h_{tot} adalah jumlah total ikatan peptida per ekuivalen protein.

Pengukuran Total Protein

Kandungan protein diukur dengan menggunakan metode Bradford [16]. Prinsip kerja metode Bradford ini melibatkan pewarna coomassie brilliant blue (CBB) yang berikatan dengan protein dalam suatu larutan yang bersifat asam sehingga memberikan warna biru. Sampel sebanyak 5 µl ditambahkan dengan 45 µl akuades dan 950 µl larutan Bradford, kemudian absorbansi diukur dengan spektrofotometer (Hitachi tipe U-2900) pada λ 595 nm. Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan standar bovine serum albumin (BSA) untuk mengetahui kandungan protein terlarut. Kemudian protein ditentukan berat molekulnya menggunakan elektroforesis SDS-PAGE (Bio-Rad) yang sesuai dengan metode Laemmli [17].

Pengujian Peredaman Radikal Hidroksil

Pengujian peredaman radikal hidroksil sesuai dengan metode deoksiribosa dengan sedikit modifikasi [18]. Larutan sampel dipreparasi dengan konsentrasi sampel 0,0002; 0,002; 0,02; 0,2; 2 µg/µl. Pengujian dilakukan menambahkan masing-masing sampel dengan FeCl₃ 100 µL 10 mM, EDTA 100 µL 1 mM, asam askorbat 50 µL 1 mM, H₂O₂ 50 µL 1 mM, buffer fosfat 150 µL 28 mM pH 7,4, deoksiribosa 50 µL 28 mM. Kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Lalu ditambahkan 400 µL TBA 1% dan 400 µL TCA 2,8% untuk memunculkan warna kromogen merah muda. Tabung reaksi berisi sampel kemudian dipanaskan pada 80°C selama 30 menit. Kemudian didinginkan dan dibaca absorbansinya pada λ 532 nm. Sebagai pembanding digunakan 2 kontrol positif yaitu dengan penambahan glutathione (GSH) dan enzim alkalase bebas.

Aktivitas antioksidan melalui peredaman radikal hidroksil (OH•) dinyatakan sebagai persen (%) penghambatan terhadap radikal hidroksil dan IC₅₀ (µg/µL). Perhitungan peredaman radikal hidroksil ditentukan dengan Persamaan 2.

$$\text{Peredaman radikal hidroksil (\%)} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

dimana A_{kontrol} merupakan nilai absorbansi tanpa penambahan sampel dan A_{sampel} adalah nilai absorbansi dengan penambahan sampel. Pengukuran IC_{50} dilakukan dengan analisis menggunakan persamaan regresi.

Elektroforesis Gel Agarosa 1%

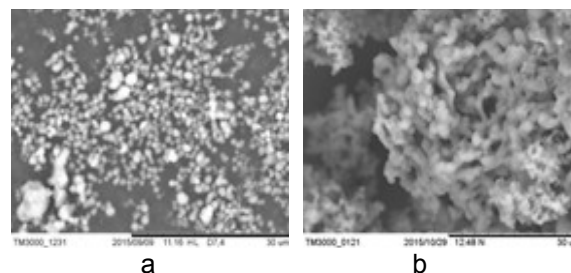
Elektroforesis gel agarosa 1% (Bio-Rad) untuk mengetahui efek proteksi ekstrak protein biji melinjo terhadap kerusakan DNA yang diinduksi radikal hidroksil dari reaksi fenton sesuai dengan metode yang dideskripsikan oleh Arnao [19]. Plasmid DNA didapatkan melalui proses kultur dan isolasi bakteri *Escherichia coli* dengan metode *mini preparation (mini-prep)* [20]. Optimasi waktu inkubasi dilakukan berdasarkan waktu 0 menit, 20 menit, dan 40 menit pada suhu 37°C. Sejumlah 0,5 µg plasmid DNA ditambah campuran larutan 30 mM H_2O_2 , 50 µM asam askorbat, dan 80 µL $FeCl_3$. Tambahkan 10 µg sampel Gg-PH dan akuades steril sampai volume akhir 20 µL. Kontrol positif dengan penambahan *glutathione* (GSH). Loading buffer ditambahkan pada sampel dengan perbandingan 1:4 sebelum dimasukkan dalam sumur gel agarosa 1%. Gel agarosa dengan pewarnaan etidium bromida dijalankan dalam buffer TBE dengan tegangan 50V selama ± 60 menit sampai terbentuk pita. Setelah elektroforesis selesai, pengamatan pita dilakukan dengan *UV transilluminator* (Major science) untuk mendeteksi bagian *supercoil* (SC) plasmid DNA dan hasil dicetak menggunakan *gel documentation* (Major science).

Analisis Data

Data dianalisis menggunakan analisis statistik *one way ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji *post hoc* tipe LSD untuk mengetahui aktivitas antioksidan yang diperoleh berdasarkan peredaman radikal hidroksil (%). Data yang diperoleh dari hasil elektroforesis gel agarosa dapat dilihat pada pita dengan cara visualisasi DNA untuk mengetahui kemampuan proteksi protein terhadap kerusakan DNA.

Hasil Penelitian

Karakterisasi morfologi enzim terimobilisasi menggunakan *scanning electron microscope* (SEM) yang ditunjukkan pada Gambar 1. Pada Gambar 1 menunjukkan morfologi matriks dan enzim alkalase terimobilisasi.



Gambar 1. Fotogram SEM; (a) matriks; (b) enzim alkalase terimobilisasi (dengan perbesaran 3000 kali.)

Hasil ekstraksi dan isolasi protein biji melinjo menunjukkan adanya penurunan perolehan protein yang didapat akibat presipitasi sebagian protein yang menghasilkan protein yang murni. Proses dilanjutkan dengan hidrolisis protein yang didapatkan penurunan perolehan protein akibat degradasi protein oleh enzim (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil produksi bertahap protein biji melinjo

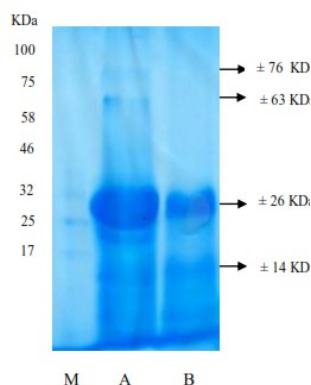
Sampel uji	Total protein (mg)	Protein awal (%)
Gg-PK	266,43	100
Gg-PI	136,00	51
Gg-PH	29,47	22

Hasil pengukuran derajat hidrolisis (%) yang bertujuan untuk memantau proses hidrolisis diperoleh sebesar 70,33%. Hasil ini menunjukkan bahwa enzim alkalase terimobilisasi mampu menghidrolisis protein isolat biji melinjo (Gg-PI) dengan baik. Selanjutnya hasil hidrolisis secara berulang ditunjukkan pada Tabel 2. Hasil menunjukkan bahwa enzim alkalase terimobilisasi efektif menghidrolisis protein hingga penggunaan keempat. Hasil elektroforesis SDS-PAGE menunjukkan terdapat empat pita protein dengan berat molekul yang berbeda yaitu ± 76, ± 63, ± 26, dan ± 14 KDa. Hasil SDS-PAGE ditunjukkan pada Gambar 2.

Aktivitas antioksidan meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi uji (Gambar 3). Gambar 3 menunjukkan bahwa Gg-PI memiliki aktivitas antioksidan paling rendah. Nilai IC_{50} dari Gg-PK, Gg-PH, Gg-PHB, dan GSH dapat dilihat pada Tabel 4. Analisis statistik menunjukkan ada perbedaan yang signifikan di antara keempat kelompok (LSD, $p < 0,05$).

Tabel 2. Penggunaan kembali enzim terimobilisasi dalam menghidrolisis protein isolat biji melinjo

Penggunaan enzim	Derajat hidrolisis (%)	Aktivitas enzim (%)	Selisih penurunan aktivitas enzim (%)
1	69,84	100	-
2	47,48	68	31
3	27,82	40	60
4	19,23	28	72



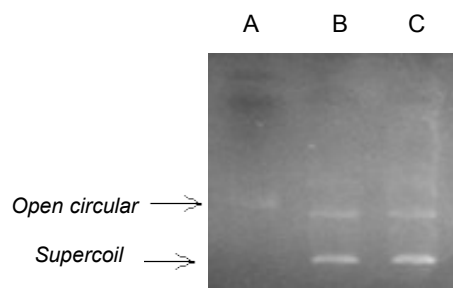
Gambar 3. Profil aktivitas antioksidan pada peredaman radikal hidroksil protein biji melinjo

Tabel 3. Nilai IC₅₀ protein biji melinjo pada pengujian peredaman radikal hidroksil

Sampel uji	Nilai IC ₅₀ (µg/µL)
Gg-PK	0,3376 ± 0,0258 ^a
Gg-PH (terimobilisasi)	0,0020 ± 0,0005 ^b
Gg-PH (bebas)	0,0008 ± 0,0003 ^b
GSH	0,0003 ± 0,0001 ^b

Keterangan: Data nilai IC₅₀ disajikan dalam rata-rata ± SD (n=3). Notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan (LSD, p<0,05)

Hasil elektroforesis gel agarosa 1% dapat dilihat pada Gambar 4. Hasil menunjukkan bahwa protein isolat biji melinjo yang terhidrolisis memiliki kemampuan melindungi terhadap kerusakan DNA akibat radikal hidroksil pada waktu 40 menit.



Gambar 4. Efek proteksi protein biji melinjo terhidrolisis pada DNA plasmid.

A : Plasmid DNA + fenton selama (kontrol negatif);
B : Plasmid DNA + fenton + Gg-PH (enzim terimobilisasi);
C : Plasmid DNA + fenton + GSH (kontrol positif)

Pembahasan

Gambar 1 menunjukkan morfologi matriks dan enzim alkalase terimobilisasi dengan perbesaran 3.000 kali. Dapat terlihat adanya perbedaan bentuk fisik antara hasil dari matriks dan enzim alkalase terimobilisasi dimana pada hasil matriks (a) terlihat berbentuk granular elips dan permukaan yang halus serta adanya jarak antar granul. Sedangkan pada hasil enzim alkalase terimobilisasi (b) berbentuk granul yang tidak beraturan dan saling terikat. Hal ini menunjukkan bahwa adanya interaksi antara enzim alkalase dan matriks. Dapat disimpulkan bahwa enzim alkalase telah terimobilisasi [21].

Hasil produksi secara bertahap pada Tabel 1 menunjukkan adanya penurunan nilai protein awal sebesar 51%. Penurunan jumlah protein karena beberapa protein tertentu yang tidak terpresipitasi atau masih larut pada pH 4 saat proses isolasi. Hal tersebut dapat dimungkinkan adanya perbedaan sifat fungsional pada setiap protein yang terkandung pada biji melinjo [22].

Presipitasi sebagian protein ini dapat disebabkan karena adanya perubahan konfigurasi protein dimana terjadi peningkatan interaksi antar molekul protein dan interaksi antara molekul protein dan air menurun [23].

Protein yang dihidrolisis secara enzimatis tersebut menyebabkan Gg-PH memiliki berat molekul lebih rendah daripada Gg-PK dan Gg-PI. Berat molekul yang kecil dapat menghasilkan konsentrasi protein yang tinggi sehingga akan menghasilkan jumlah protein rendah [24]. Hidrolisis dikatakan baik jika diperoleh nilai derajat hidrolisis lebih dari 30% [25]. Pengukuran derajat hidrolisis diperoleh sebesar 70,33%. Hasil ini menunjukkan bahwa enzim

alkalase terimobilisasi mampu menghidrolisis protein isolat biji melinjo (Gg-PI) dengan baik.

Enzim alkalase terimobilisasi dapat digunakan hingga 4 kali pengulangan dalam menghidrolisis protein isolat (Tabel 2). Namun terjadi penurunan aktivitas enzim pada penggunaan ke-3 dan ke-4. Penurunan aktivitas enzim berhubungan dengan kestabilan dari daya katalis pada molekul enzim yang kemungkinan menyebabkan enzim keluar dari gel pada saat pemakaian [26]. Penggunaan enzim secara berulang ini dilakukan untuk meminimalisir penggunaan enzim alkalase bebas yang kurang ekonomis.

Gambar 2 menunjukkan terdapat empat pita protein dengan berat molekul yang berbeda yang mengalami pemedaran pada protein Gg-PH. Hal tersebut menandakan bahwa protein berhasil dihidrolisis secara enzimatis menggunakan enzim alkalase terimobilisasi [27].

Profil hubungan antara konsentrasi protein dan peredaman radikal hidroksil (%) disajikan pada Gambar 3 yang menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi sampel, maka peredaman radikal hidroksil semakin meningkatkan. Hal ini disebabkan pada sampel yang semakin banyak, maka semakin tinggi kandungan antioksidannya sehingga berdampak juga pada tingkat penghambatan radikal bebas yang dilakukan oleh zat antioksidan tersebut [28].

Selain itu, peredaman radikal hidroksil juga dinyatakan dengan nilai IC_{50} yang ditunjukkan pada Tabel 3. Semakin kecil nilai IC_{50} maka aktivitas antioksidan melalui peredaman radikal hidroksil semakin besar dan sebaliknya [29]. Dapat dikatakan bahwa protein terhidrolisis merupakan protein yang memiliki tingkat peredaman radikal hidroksil lebih efektif dari protein kasar karena protein terhidrolisis memiliki nilai IC_{50} lebih kecil dari protein kasar. Pengukuran nilai IC_{50} tidak dilakukan pada sampel Gg-PI karena hasil peredaman radikal hidroksil yang diperoleh tidak mencapai 50% (Gambar 3).

Hasil analisis statistik hasil uji *one way* ANOVA yang dilanjutkan dengan uji *post hoc* LSD menunjukkan bahwa kelompok sampel Gg-PH (terimobilisasi) lebih bagus daripada sampel Gg-PK. Sedangkan kelompok sampel Gg-PH tidak berbeda signifikan terhadap sampel Gg-PH (bebas) maupun terhadap kontrol (GSH). Hal ini dapat dikatakan bahwa protein biji melinjo baik yang dihidrolisis dengan alkalase terimobilisasi

dan bebas memiliki aktivitas yang sama seperti glutathione (GSH).

Penambahan protein terhidrolisis (Gg-PH) biji melinjo pada plasmid DNA dengan perbandingan 1:20 memberikan gambaran pita *supercoil* yang lebih tebal dibandingkan dengan plasmid yang tidak diberi protein terhidrolisis (Gg-PH) dengan waktu inkubasi yang sama. Hal tersebut menandakan bahwa protein terhidrolisis (Gg-PH) memiliki aktivitas antioksidan terhadap radikal hidroksil sama dengan kontrol positif (GSH) serta dapat melindungi kerusakan DNA dan kemampuan Gg-PH dalam menghambat kerusakan plasmid DNA berhubungan dengan hasil pengukuran pada peredaman radikal hidroksil (Gambar 4).

Simpulan dan Saran

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian yang telah dilakukan yaitu protein biji melinjo (Gg-PH) terhidrolisis menggunakan alkalase terimobilisasi memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi dalam meredam radikal hidroksil dibandingkan protein kasar dan protein isolat yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} sebesar $0,0020 \pm 0,0005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Penggunaan plasmid DNA : protein (1:20) pada elektroforesis gel agarosa 1% mampu memproteksi DNA dari kerusakan akibat radikal hidroksil.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Divisi Nutrasetikal dan Farmasetikal CDAST Universitas Jember yang telah mendanai penelitian ini.

Daftar Pustaka

- [1] Indrawati L, Werdbasari A, Yudi A. Hubungan pola kebiasaan konsumsi kebiasaan masyarakat miskin dengan kejadian hipertensi di Indonesia. MPPK. 2009; 19: 174-184.
- [2] Handjani A, Roosierhermatie B, Maryani H. Faktor-faktor yang berhubungan dengan pola kematian pada penyakit degeneratif di Indonesia. BPSK. 2009; 13: 42-53.
- [3] Kalt W, Forney CF, Martin A, Prior RL. Antioxidant capacity, vitamin c, phenolics, & anthocyanins after fresh storage of small fruits. JAF. 1999; 47: 4638-4644.
- [4] Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology & medicine. (Third Edition). New York: Oxford University; 1999.
- [5] Tampubolon W. Badan penerbitan tanaman hutan. Makasar: BPTH; 2013.

- [6] Siswoyo TA, Aldino M, Ningsih W, Okviandri P. Isolasi protein antioksidan dari biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.). PPBM. 2007; 7: 1045-1052.
- [7] Sembodo TA. Uji aktivitas antioksidan secara in vitro & kemampuan proteksi terhadap kerusakan DNA dari protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.). Skripsi. 2015. Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- [8] Sediaoetama AD. Ilmu gizi 1. Jakarta : PT Dian Rakyat; 2010.
- [9] Siswoyo TA, Restanto DP, Handoyo T. Produksi pengembangan protein antioksidan generasi baru dari *Gnetum gnemon* protein sebagai bahan nutraceutical komersial. 2013. [27 Februari 2016]. <https://www.researchgate.net/publication>.
- [10] Bintang M. Biokimia teknik penelitian. Jakarta: Erlangga; 2010.
- [11] Reetz MT, Tielmann P, Wiesenhofer W, Konen W, Zonta A. Second generation sol-gel encapsulated lipases: robust heterogeneous biocatalysts. ASC. 2003; 345: 717-728.
- [12,23] Salcedo-Chavez B, Osuna-Castro JA., Guevara-Lara F, Dominguez J, Paredes-Lopez O. Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds. JAF. 2002; 50: 6515-6520.
- [13] Matra NF. Hidrolisis protein isolat biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) menggunakan alkalase terimobilisasi & aktivitasnya sebagai antihipertensi. Fakultas Farmasi Universitas Jember. Skripsi. 2016. Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- [14] Siswoyo TA, Sugiharto B. Produksi pengembangan protein antihipertensi generasi baru dari *Gnetum gnemon* protein sebagai bahan nutraceutical komersial. PIS. 2012; 217-222.
- [15] Nielsen S. Introduction of food analysis dalam s. Nielsen (ed.). 2010. Food Analysis Third Edition. New York: Plenum; 2001.
- [16] Bradford MM. A rapid & sensitive methode for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. AB. 1976; 72: 248-254.
- [17] Laemmli. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis & proteomics of cerebrospinal fluid. Vrije Universiteit Amsterdam; 1970.
- [18] Kumar GP, Navya A, Grace K. DNA damage protecting & free radical scavenging properties of *Terminalia arjuna* in pc-12 cells & plasmid DNA. JFRA. 2013; 3: 35-39.
- [19] Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radical : a practical case. TFSC. 2000; 11: 419-421.
- [20] Sambrook J, Russell DW. The condensed protocols from molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2006.
- [21] Gokgoz M, Yigitoglu M. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on to modified carboxymethylcellulose for production of ethanol. BBE. 2011; 34: 849-857.
- [22] Siswoyo TA. Effect of sodium chloride on thermal properties of 30 KDa protein isolated from melinjo seed. JTIP. 2006. 17: 214-220.
- [24] Zhidong L, Benheng G, Xuezhong C, Yun D, Hongliang H, Wen R. Optimisation of hydrolysis conditions for antioxidant hydrolysate production from whey protein isolates using response surface methodology. IJAFR. 2013; 52: 53-65.
- [25] Himonides AT, Taylor AKD, Morris AJ. A study of the enzymatic hydrolysis of fish frames using model system. FNS. 2011; 2: 575-585.
- [26] Sebayang F. Pengujian stabilitas enzim bromelin yang diisolasi dari bonggol nanas serta imobilisasi menggunakan kappa karagenan. JSK. 2006; 10:20-26.
- [27] Pace CN, Trevino S, Prabhakaran E, Scholtz JM. Protein structure, stability & solubility in water & other solvents. Phil. Sac. Land. The Royal Society; 2004.
- [28] Ulfa FS, Anggo AD, Romadhon. Uji potensi aktivitas antioksidan dengan metode ekstraksi bertingkat pada lamun dugong (*Thalassia hemprichii*) dari perairan jepara. JPBHP. 2014; 3: 32-39.
- [29] Nugroho AE, Yuniarti N, Estyastono EP, Supardjan, Hakmin L. Determination of antioxidant activity of dehydrozingeron through hydroxyl radical scavengers using deoxyribose method. MFI. 2006; 17: 116-12.